Studien über den mikrochemischen Nachweis verschiedener Zuckerarten in den Pflanzengeweben mittels der Phenylhydrazinmethode

von

Dr. **Viktor Grafe.**

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien.

(Mit 2 Tafeln.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 2. März 1905.)

I. Einleitung.

Zahlreiche Methoden wurden bereits zum Zwecke des Nachweises von Zucker in den Pflanzengeweben auf mikrochemischem Wege ins Leben gerufen, doch entsprach keine den Anforderungen vollständig, teils wegen Mehrdeutigkeit der Reaktion, die auch von Nicht-Zuckern hervorgerufen sein konnte, teils wegen der geringen Haltbarkeit der Reagentien, welche zur Verwendung gelangen mußten. Anschließend an die Arbeiten Emil Fischer's[1] und dessen makrochemischen Zuckernachweis mittels Phenylhydrazins fand Senft[2], daß sich diese außerordentlich schöne, dabei eindeutige und bequeme Methode auch zum mikrochemischen Nachweise des Zuckers in den Geweben eigne. In seiner Arbeit findet man auch eine Kritik der älteren Methoden. Senft vermag durch sein Verfahren-Einlegen der Schnitte in ein Gemisch von je einem Tropfen Phenylhydrazinchlorhydrats und Natriumacetats, welche beide in 10prozentiger Glyzerinlösung angewendet werden,

[1] Fischer Em., Synthesen in der Zuckergruppe. Ber. d. d. chem. Ges., *23*, 2114 (1890) und Fortsetzungen.

[2] Senft Em., Über den mikrochemischen Zuckernachweis durch essigsaures Phenylhydrazin. Diese Sitzungsberichte, Bd. CXIII, Abt. I, 1904.

in der Kälte und besonders nach erfolgter $^1/_2$stündiger Behandlung am kochenden Wasserbade die Osazone in Sphärokristallen oder schönen Kristallnadelbüscheln abzuscheiden. Wichtig ist die Möglichkeit der Durchführung dieser Reaktion auch in der Kälte, wobei es allerdings erst nach 24 Stunden bis 5 Tagen zur Osazonbildung kommt; denn nur Monosen sind befähigt, in der Kälte Osazone zu bilden, Biosen aber nicht direkt, sondern erst nach erfolgter Inversion, die eben durch das Kochen am Wasserbad vor sich geht. Dies fand auch Senft durch seine Versuche bestätigt und sein Verfahren kann daher, je nachdem es in der Kälte oder in der Siedhitze angewendet wird, zur Unterscheidung der Monosen und der Saccharose dienen. Doch sei gleich hier erwähnt, daß die Reaktion auch bei vieltägigem Stehen oft in der Kälte nicht eintritt, wenn auch evident Monosen vorhanden sind, namentlich wenn deren Prozentgehalt ein geringer ist, sondern auch da erst in der Wärme.

Die verdienstvolle Arbeit Senft's lehrt uns also eine vortreffliche mikrochemische Reaktion auf Zucker im allgemeinen kennen und gibt im besten Fall eine Unterscheidung zwischen Monosen und Saccharose, sie läßt aber nicht erkennen, welches Zuckerindividuum wir im pflanzlichen Gewebe vor uns haben. Nun ist es aber namentlich aus physiologischen Gründen oft von Wert, konstatieren zu können, in welcher individuellen Form der Zucker vorhanden ist, namentlich mit Bezug auf dessen Speicherung, Wanderung und Wiederablagerung. Von Monosen des Pflanzenreiches sind wohl nur die *d*-Glukose, die *d*-Fruktose und die Sorbose in Betracht zu ziehen, da nur die genannten frei in der Pflanze gefunden werden, während andere Zucker, wie *d*-Mannose, *d*-Galaktose, namentlich aber die Pentosen: Arabinose, Xylose etc. sowie Methylpentosen, wie Rhamnose, Fukose etc. lediglich als Kondensationsprodukte oder Ester aromatischer Verbindungen vorkommen.[1] Von Biosen sind namentlich Saccharose und Maltose ins Auge zu fassen. Ich stellte mir die Aufgabe, auch mikrochemisch zwischen den bezeichneten Zuckerarten unterscheiden zu können.

[1] Czapek F., Biochemie der Pflanzen, I, p. 199, Jena 1905.

II. Methode.

Für die Erkennung und Isolierung der Fruktose sowie deren Unterscheidung von der Glukose fand ich das sekundäre asymmetrische Methylphenylhydrazin $\begin{matrix} C_6H_5 \\ CH_3 \end{matrix} > N.NH_2$ besonders geeignet. Nach den Untersuchungen von Neuberg[1] geben mit dieser Hydrazinbase nur die Ketozucker, niemals aber die Aldozucker ein charakteristisches Methylphenylosazon. Dieses Reagens ist um so geeigneter, zur Identifizierung der Fruktose verwendet zu werden, als auch andere in der Natur vorkommende Ketosen, wie die erwähnte Sorbinose, das Methylphenylosazon nur in Form eines Sirups, nicht aber so wie die Fruktose sofort in kristallisierter Form geben. Die Empfindlichkeit der Reaktion, die man in Bezug auf die Phytochemie wohl als spezifische Fruktosereaktion ansprechen kann, ist etwas geringer als die der Senft'schen Probe.

Während die Phenylosazonbildung bei Traubenzucker noch bei einem Traubenzuckergehalt der Probe von 0·015 Prozent[2] deutlich und charakteristisch eintritt, habe ich das Eintreten der Methylphenylosazonbildung bei Fruktose nur bei einem Mindestgehalte der Lösung von 0·08 Prozent an Fruktose konstatieren können. In allerjüngster Zeit glaubte übrigens Ofner[3] auf Grund seiner Versuche die Eindeutigkeit der Reaktion anzweifeln zu müssen, da es ihm gelungen war, das Methylphenylosazon auch der Glykose, allerdings auf recht ungewöhnlichem Wege, gänzlich abweichend von der Neuberg'schen Vorschrift und erst nach 5tägiger Einwirkung in sehr geringer Ausbeute zu erhalten, während das betreffende Osazon der Fruktose schon nach 5 bis 10 Minuten langer Behandlung am Wasserbade und darauffolgendem mehrstündigen Stehen in fast theoretischer Ausbeute gewonnen wird.

---

[1] Ber. d. d. chem. Ges., *35*, 959, 2626 (1902), E. Fischer, ebendaselbst *22*, 91 (1889), Zeitschr. d. Vereines d. deutschen Zuckerindustrie, *52*, 246; Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 36, p. 227 (1902).

[2] E. v. Lippmann, Die Chemie der Zuckerarten, I, p. 565, III. Aufl., 1904.

[3] Ber. d. d. chem. Ges., *37*, 2623, 3362, Dezemberheft d. Monatsh. f. Chemie p. 4399.

Überdies ist bei Ofner's langandauerndem Prozeß auch eine teilweise Umlagerung der Glykose in Fruktose im Sinne Lobry de Bruyns und van Ekensteins durchaus nicht ausgeschlossen. Auf alle diese Umstände, die übrigens zum Teil auch schon Ofner in seiner Abhandlung anführt, hat dann auch Neuberg[1] hingewiesen und im Einklang mit den Ergebnissen von Kontrollversuchen festgestellt, daß die Eindeutigkeit der Methylphenylhydrazinreaktion auf Ketosen auch ferner zu Recht besteht. Auch ich habe bei der im folgenden beschriebenen Arbeitsweise auf dem Objektträger in zahllosen Einzelversuchen mit reiner Glykose und Fruktose bei den verschiedensten Konzentrationsgraden stets nur bei letzterer einen positiven Erfolg der Methylphenylhydrazinmethode, d. h. Osazonbildung, feststellen können, während bei Glykose auch nach vielen Tagen lediglich ein undefinierbarer Sirup zu beobachten war. Zur Ausführung der Reaktion benützte ich Methylphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat, welche beide nach Senft's Angabe getrennt in käuflichem Glyzerin im Verhältnisse 1 : 10 aufgelöst und für sich in Stiftfläschchen aufbewahrt wurden. Die Auflösung der Base geht leicht in der Kälte vor sich und ist jedenfalls nach einigen Stunden Stehens und Durchschüttelns vollendet. Die Lösung nimmt mit der Zeit dunkelrote Farbe an, soll aber keinen oder nur schwachen Geruch zeigen.

Man vermeide es, die Auflösung durch Erwärmen zu beschleunigen, um eine etwaige Abspaltung von Phenylhydrazin zu vermeiden. Da in dem käuflichen Methylphenylhydrazin stets etwas Phenylhydrazin beigemengt zu sein pflegt, ist es empfehlenswert, sich die Base selbst darzustellen: Ein Gemisch[2] von 5 Teilen käuflichen Methylphenylnitrosamins und 10 Teilen Eisessig wird allmählich unter fortwährendem Umrühren in ein Gemenge von 35 Teilen Wasser und 20 Teilen Zinkstaub eingetragen, wobei man die Temperatur der Flüssigkeit durch sukzessiven Zusatz von 45 Teilen Eis auf 10—20° hält.

---

[1] Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 37, Heft 17, p. 4616 (1904).

[2] E. Fischer, Ann. d. Chemie 190, p. 153 (1877), 236, p. 198 (1886); H. Mayer, Analyse und Konstitutionsermittlung organ. Verbindungen, p. 417.

Nachdem das Gemisch unter öfterem Umrühren noch einige Stunden bei gewöhnlicher Temperatur gestanden, wird bis fast zum Sieden erhitzt, nach einiger Zeit heiß filtriert und der zurückbleibende Zinkstaub mehrmals mit warmer stark verdünnter Salzsäure extrahiert, der Extrakt mit dem Filtrat vereinigt. Die Base wird warm durch einen sehr großen Überschuß konzentrierter Natronlauge abgeschieden und das Öl in Äther aufgenommen. Nach Abdunsten des Äthers wird mit 40prozentiger Schwefelsäure versetzt, auf 0° abgekühlt und mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols verdünnt. Die abgeschiedene Kristallmasse wird mit Alkohol gewaschen, abgepreßt und aus siedendem absoluten Alkohol umkristallisiert. Das so gereinigte Sulfat wird durch konzentrierte Lauge zerlegt und die in Freiheit gesetzte Base im Vakuum destilliert. (S. P. 131° bei 35 *mm*.)

Das so gewonnene reine Methylphenylhydrazin wird in möglichst wenig Äther gelöst und sodann sorgfältig von Wasser befreites Salzsäuregas darübergeleitet. Es muß ein Eintauchen der aus dem Salzsäure entwickelnden Kolben in das die ätherische Lösung enthaltende Gefäß führenden Röhre in die Ätherlösung vermieden werden, da sonst leicht Zurücksteigen erfolgt. Alsbald scheidet sich das Chlorhydrat als voluminöse weiße Kristallmasse ab, die rasch abgesaugt, mit Äther nachgewaschen und getrocknet werden muß; sie wird bis zur Auflösung in Glyzerin zweckmäßig in einem blauen Glasfläschchen mit eingeriebenem Stöpsel aufbewahrt. Man kann natürlich auch statt des Chlorhydrats + Natriumacetat die freie Base verwenden, welche mit der für die Umsetzung zu essigsaurem Methylphenylhydrazin berechneten Menge 50prozentiger Essigsäure versetzt wurde, doch habe ich gefunden, daß die Resultate mit diesem Reagens nicht immer zufriedenstellend ausfielen, so daß ich in der Folge dem Methylphenylhydrazinchlorhydrat den Vorzug gab; ich vermute, daß das NaCl, welches bei der Umsetzung des Chlorhydrats und Natriumacetats entsteht, »aussalzend« wirkt und so die Entstehung des Osazons begünstigt. Ein Tropfen des in Glyzerin gelösten salzsauren Methylphenylhydrazins wird auf dem Objektträger mit einem Tropfen des in Glyzerin gelösten Natriumacetats

innig gemengt und dann die Schnitte eingelegt. Nachdem man dafür Sorge getragen hat, daß sie mit dem Reagens allseitig in Berührung getreten sind, wird mit dem Deckglas bedeckt und das eine Präparat bis auf weiteres bei Zimmertemperatur stehen gelassen, das andere am Wasserbade höchstens 10 Minuten erhitzt.

Nach kürzerem oder längerem Stehen, je nach Konzentration, bei den kalt behandelten Präparaten oft erst nach 3 bis 4 Tagen, scheidet sich das Fruktosemethylphenylosazon ab. Die Form der Osazonkristalle ist recht verschieden, bald erscheinen sie als Garbenbündel von Kristallnadeln, bald als sternförmige Aggregate, dann wieder als Sphärite oder warzenförmig, sehr oft in gelappten oder strukturlosen Schollen. Ebenso wechselt die Farbe von hellgelb bis gelbrot und braun. In heißem Alkohol löslich, kristallisieren sie beim Verdunsten desselben in schönen Kristallbüscheln aus. Ebenso wie Senft habe ich die Erfahrung gemacht, daß Zuckerlösungen respektive wasserreiche Gewebe, welche den Zucker in Lösung enthielten, viel schnellere und charakteristischere Osazonbildung ergaben als Zuckerkörnchen oder wasserarme Gewebe zuckerreicher Objekte.

Um Objekte nacheinander auf Glykose, Fruktose, Saccharose und Maltose zu prüfen, ging ich folgendermaßen vor:

Eine Serie von Schnitten wurde in der oben angegebenen Weise mit dem Methylphenylhydrazin-Reagens behandelt, eine Operation, die ich in Hinkunft der Kürze halber mit I bezeichnen werde, und zwar die eine Hälfte in der Kälte (I*a*), die andere mit 10 Minuten andauerndem Kochen am Wasserbade. Diese kurze Kochdauer führt, wie Parallelversuche mit reiner Saccharose ergeben haben, in der Regel noch nicht zur Inversion etwa vorhandenen Rohzuckers, doch ist es zweckmäßiger, die Erwärmung im Brutofen bei zirka 40° durch mehrere Stunden vorzunehmen (I*b*). Ergab einer dieser Versuche das Auftreten von Osazonkristallen, so konnte auf das Vorhandensein von Fruktose geschlossen werden, da Glykose mit diesem Reagens nicht in Reaktion tritt, Rohrzucker aber bei richtig geleitetem Prozeß noch nicht invertiert sein konnte.

Eine zweite Serie von Schnitten desselben Objektes wurde mit dem Senft'schen Reagens ebenso in der Kälte (II*a*) und

Wärme (II*b*) behandelt. Fiel die Reaktion positiv aus, so konnte sowohl Fruktose als auch Glykose die Ursache der Osazonbildung sein; doch hatte schon der erste Versuch die An- oder Abwesenheit von Fruktose dargetan. Die Vornahme der Reaktionen in der Kälte bezweckte, den Zucker, welcher in der Wärme aus den Zellen hinausdiffundiert, eventuell zum Teil im Gewebe beobachten zu können.

Eine dritte Serie wurde mit dem Senft'schen Reagens 1 bis $1^1/_2$ Stunden am kochenden Wasserbade erwärmt, wobei die Saccharose und zum Teil auch die Maltose durch die Einwirkung des Glyzerins[1] invertiert wird (III), was sich natürlich in einer bedeutenden Vermehrung der gebildeten Osazonkristalle ausdrückt. War bloß oder vorwiegend Maltose vorhanden, welche in zwei Moleküle Glykose zerfällt, so gibt Methylphenylhydrazin natürlich keine Vermehrung der Fruktose-Methylphenylosazone. Überdies bildet sich nach $1^1/_2$ stündiger Kochdauer und folgendem Erkalten (IV) das Maltosephenylosazon, welches durch seine charakteristischen Formen — es kristallisiert in flachen, breiten Einzelnadeln, nie in Aggregaten[2] — leicht unter den übrigen Osazonen identifiziert werden kann. Sehr gute Resultate erhielt ich auch mittels der Invertinmethode[3], welche die Inversion des Zuckers ohne Anwendung von Hitze gestattet; das Verfahren wurde stets zur Kontrolle verwendet. Die Schnitte wurden nach Hofmeister's Vorschrift mit der Invertinlösung (Merck'sches Präparat) behandelt und dann erst der Phenylhydrazinreaktion unterworfen.

Es sind folgende Objekte nach der beschriebenen Methode auf Glykose, Fruktose, Saccharose und Maltose untersucht worden:

---

[1] Donath, Journ. f. prakt. Chemie, II, *49*, 546, 556.

[2] Rolfe und Haddock, American chemical Journal, *25*, 1015; Fischer, Ber. d. d. chem. Ges., *17*, 579; *20*, 821; Fischer und Tafel, ebendaselbst *20*, 2566.

[3] Czapek, Über die Leitungswege der org. Baustoffe im Pflanzenkörper. Diese Ber. CVI, I, März 1897; Hofmeister, Pringsheims Jahrb. für wiss. Botanik, Bd. 31, p. 688 (1897).

1. Früchte.

Birne (sehr zuckerreiche Spezies): Fruchtfleisch. I*b* zeigte schon nach zwei Stunden sehr reichliche Abscheidung von Sphäriten (Taf. I, 4). I*a* ergab nach zwei Tagen schöne verzweigte Sterne (Taf. I, 5). II*a* und *b* lieferten massenhafte Nadelbüschel. Nach Behandlung mit III war das ganze Präparat mit Osazonsphäriten erfüllt, welche einander in der Ausbildung gehemmt hatten. Auch Methylphenylhydrazin ergab nach dem Kochen am Wasserbad eine sehr reichliche Vermehrung der Methylphenylosazonbildung.

Es war also Fruktose, Dextrose und Saccharose vorhanden.

Apfel: Nach I*a* Methylphenylosazonkristalle in schönen Sternaggregaten (Taf. I, 1). II*b* Kristallbildung in stark vermehrtem Maß. Ebenso mit III nach der Inversion. Vorhanden: Fruktose, Dextrose, Saccharose.

Rosine: Gab schon mit 1*b* und II*b* ein solches Gewirr brauner Nadeln, daß eine etwaige Vermehrung der Kristallbildung nach der Inversion nicht mehr konstatiert werden konnte.

Tomate (Fruchtfleisch): Mit I*a* nach 24 Stunden Reaktion, mit 1*b* nach etwa einer Stunde. Mit II*a* und II*b* konnte eine Vermehrung der Kristallbildung nicht konstatiert werden. Wohl aber nach der Inversion mit III und ebenso nach Anwendung der Invertinmethode. Vorhanden daher: Fruktose und Saccharose.

Frucht des Johannisbrotbaumes: Möglichst dünne Querschnitte durch die zähe Frucht ergaben nach Behandlung mit den Reagentien: Fruktose und Saccharose.

Feige (getrocknet): Ein wenig von dem Fruchtfleisch wurde mit der Nadel herausgezupft und mit dem Reagens unter dem Deckglas zerquetscht. Die Kristalle sonderten sich in schollenförmigen Aggregaten besonders am Deckglasrande ab. Vorhanden: Fruktose, Saccharose, Dextrose (wahrscheinlich aus Invertzucker).

2. Blüten.

Bassia latifolia (Mohra): Die Untersuchung ergab sehr reichliches Vorhandensein von Dextrose, Fruktose (Invertzucker), Saccharose.

Tulpe: Querschnitte durch den Blütenboden: I*a* ergab erst nach vier Tagen, I*b* nach zehnstündiger Behandlung Abscheidung von feinen Nadeln und braunen Schollen, II*a* und *b* wesentlich reichlichere Mengen von Sphäriten. Bei Behandlung mit III zeigten sich zahlreiche Osazonbüschel (Taf. I, 3) von hellgelber Farbe, mit Methylphenylhydrazin nach der Inversion große Sphärite (braun) (Taf. I, 7). Dextrose, Fruktose, Saccharose.

Narzisse: Querschnitt durch den Blütenboden ergab nach Behandlung mit allen Reagentien Saccharose, Dextrose, aber keine Fruktose.

Hyazinthe: Querschnitt durch den Blütenboden lieferte Saccharose, Dextrose und Fruktose.

3. Wurzeln.

Beta vulgaris: I*a* ergab nach einigen Tagen sehr reichliches Auftreten von Fruktose-Methylphenylosazonsternen im Parenchym, und zwar desto reichlicher, je mehr gegen die Mitte zu der Schnitt geführt worden war.

Nach der Inversion konnte daselbst auch der meiste Rohrzucker nachgewiesen werden im Einklang mit den diesbezüglichen Untersuchungen Wiesner's.[1] Die Gefäßwände färbten sich braun, ohne daß es jedoch dort zu einer Kristallausscheidung kam. Das Fruktoseosazon tritt hier in den verschiedenartigsten Formen auf, in verästelten Zweigen, die nicht selten zu sternförmigen Gebilden zusammentreten oder auch in feinen Nadeln, die stets die charakteristische braune Farbe zeigen. II*a* ergab vermehrtes Auftreten von Osazonkristallen. Es konnte auf Saccharose, Fruktose und Dextrose geschlossen werden. Maltose fand sich in den Zuckerrüben, die mir zur Verfügung standen, nicht.

Von besonderem Interesse war die individuelle Form, in welcher der Zucker beim Keimen und Treiben auftritt und wie dabei die einzelnen Zuckerarten ineinander übergehen. Einige

[1] Öst.-ung. Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirtschaft, *20*, 850; Wiesner, Unters. über das Auftreten von Pektinkörpern in den Geweben der Runkelrübe. Sitz. Ber. d. k. Akad., Wien, I, II. Abt., p. 442.

dieser Verhältnisse wurden bei den diesbezüglichen Prozessen an: Kartoffel, *Allium cepa*, Gerste, *Acer campestre* und *Broussonetia papyrifera* studiert.

Kartoffel: Am 23. Dezember wurden zwei Knollen auf ihren Zuckergehalt untersucht. Die Zellen erwiesen sich mit Stärke vollgepfropft, ohne daß eine Zuckerreaktion hätte konstatiert werden können. Beide wurden einer Temperatur von 0° C. durch 24 Stunden ausgesetzt und dann von neuem untersucht. Es erwies sich das Vorhandensein von Dextrose und Saccharose, doch konnte Fruktose nicht konstatiert werden. Die Knollen wurden nun im Dunkeln angetrieben. Am 10. Jänner wurden die ersten Sprosse untersucht und zeigten sehr reichliche Fruktose- und Dextrosebildung, weshalb das Saccharosevorkommen schwer zu konstatieren war. Nach der Inversion trat jedoch kaum eine Vermehrung der Osazonbildung ein. Sehr deutlich konnte jedoch Saccharose nachgewiesen werden, als die etiolierten Sprosse beiläufig Fingerlänge erreicht hatten. In Parallelversuchen wurde der Zuckergehalt der treibenden Knollen bestimmt. Es ließ sich in keinem Stadium der treibenden Knollen Dextrose[1] oder Fruktose, sondern lediglich Saccharose nachweisen.

Allium cepa: Am 5. Dezember wurden die zum Treiben bestimmten Zwiebeln untersucht. In den Zwiebelschuppen fand sich reichliches Vorkommen von Dextrose. Fruktose war nicht vorhanden. Nach der Inversion war eine reichliche Vermehrung der Osazonkristalle (Taf. I, 8) zu beobachten, doch zeigte sich auch jetzt noch nicht das Vorhandensein von Fruktose. Obwohl auch Maltosazonbildung bei Behandlung mit IV nicht eintrat, konnte doch geschlossen werden, daß der invertierbare Zucker sicherlich nicht Rohrzucker (entsprechend einer alten Angabe von E. Schultze)[2], wahrscheinlich aber Maltose war, welche zu Dextrose invertiert wurde. Anfang Jänner begann eine Zwiebel (aufgestellt an einem halbdunklen Ort) zu treiben. Die Untersuchung der noch nicht ergrünten Blätter ergab denselben Befund wie die der Zwiebel. Gegen Mitte

[1] Wiesner, Öst.-ung. Zeitschr. f. Zuckerindustrie u. Landw., XVIII, 409.
[2] Zit. bei C. Hofmeister, Pringsh. Jahrb. d. Bot., Bd. XXXI, 688 (1897).

Jänner, als die Blätter schon ziemlich groß und ergrünt waren, wurde eine Untersuchung von Zwiebel und Blatt vorgenommen. Die Zwiebel zeigte nunmehr Dextrose und Fruktose, nach der Inversion jedoch kaum eine Vermehrung der letzteren. Es mußte also ein Teil der Glykose sich in Fruktose umgelagert haben. Das junge Blatt wies Dextrose, Fruktose und Saccharose auf. Nachdem die Pflanzen ans Licht gestellt worden waren und starke grüne Blätter ausgebildet hatten, wurden diese untersucht. Die Chlorophyllkörner waren rostrot gefärbt.

Der Querschnitt durch das Blatt ließ mit II*a* nach etwa zwei Tagen schöne Nadelbüschel von Dextroseosazon, mit I*a* charakteristische braune Büschel und Einzelnadeln von Fruktosemethylphenylosazon (Taf. II, 1) und eine reichliche Vermehrung beider nach der Inversion auf dem kochenden Wasserbade erkennen (Taf. I, 6, und Taf II, 2). In Taf. I, Fig. 6, ist die Masse der in einem Stern vereinigten Kristallnadeln so groß, daß die ursprünglich hellbraune Farbe der Nadeln bräunlich-rot erscheint. Es sei hier bemerkt, daß man schon nach der Farbe das Dextrosephenylosazon und das Fruktosemethylphenylosazon unterscheiden kann. Ersteres ist stets gelb bis gelbbraun, letzteres bräunlich bis braunrot. Das gilt für die Ausscheidung unter normalen Verhältnissen. Nimmt man ein Umkristallisieren des gebildeten Osazons durch Auflösen in heißem Alkohol und Verdunstenlassen des Lösungsmittels vor, so erhält man allerdings auch das Fruktosazon gelblich (Fig. 2 in Taf. I, während Fig. 1 und 5 nicht umkristallisierte Typen darstellen).[1] In Fig. 2 der Taf. II liegen die Osazonsterne im ganzen Parenchym verstreut, während das Xylem frei ist, es muß jedoch erwähnt werden, daß dieselben bisweilen auch im Xylem zu beobachten waren (Taf. II, 3), doch ist es nicht ganz gewiß, ob dieser Umstand nicht bloß der Präparationsmethode zuzuschreiben ist. Regelmäßig aber erscheinen sie im Siebteile des Gefäßbündels. Gegen die Blattspitze nahm die Ausscheidung der Sphärite nach der Inversion am kochenden Wasserbade zu. Im grünen Blatt also war Dextrose, Fruktose und Saccharose, jedoch keine Maltose vorhanden.

[1] Die feinere Nuancierung der Farben ließ sich leider durch den Druck nicht wiedergeben.

Gerste: Schnitte durch das Endosperm des ruhenden Kornes ergaben beim Kochen am Wasserbade mit den Zuckerreagentien Goldgelbfärbung respektive Braunfärbung des Präparates, besonders dort, wo reichlich Stärke angehäuft lag; doch kam es selbst nach vielen Tagen nicht zu einer Osazonausscheidung. Es ist — das sei an dieser Stelle bemerkt — oft notwendig, das Objekt Wochen hindurch zu beobachten, denn es ist vorgekommen, daß sich eine Reaktion erst nach vielen Tagen zeigte und noch häufiger geschah es, daß noch nach Wochen eine fortwährende Vermehrung der Osazonbildung eintrat, z. B. beim Blatt von *Allium cepa*, so daß das einmal festgehaltene Bild auch für die zeichnerische Darstellung unliebsame Veränderungen bot. Nachdem die Gerstenkörner 24 Stunden in Wasser quellen gelassen worden waren, um zum Keimen gebracht zu werden, ergab IV das Auftreten von charakteristischen hellgelben Maltosazonsternen, wie sie Fig. 4 in Taf. II zeigt. Andere Zuckerarten ließen sich in diesem Stadium nicht nachweisen. Nach drei Tagen wurden die Keimlinge untersucht. I *a* und II *a* ergaben geringe Mengen von Dextrose und Fruktose. Nach der Inversion war auch Saccharose als Dextrose und mit IV sehr reichlich Maltose zu konstatieren. Fig. 5 auf Taf. II zeigt das Auftreten der Blättchen von Maltosazon in demselben Präparate neben den strahligen Gebilden von Dextrosephenylosazon, herrührend von der invertierten Saccharose. Im jungen Blatt endlich, besonders reichlich an Quer- und Längsschnitten der Blattscheide, konnte schon in der Kälte Fruktose und Glykose in ziemlich großer Menge nachgewiesen werden, Saccharose aber erst deutlich in einem späteren Stadium der Entwicklung. Maltose war in keinem Falle vorhanden.

Broussonetia papyrifera: Eine eingetopfte, in Winterruhe befindliche Pflanze wurde gegen Mitte Dezember ins Warmhaus gestellt. Die Untersuchung, an Stamm- und Querschnitten durchgeführt, ergab nicht eine Spur von Zucker. Die verholzten Elemente färbten sich intensiv gelb. Die Proben wurden in Intervallen von fünf Tagen bis gegen Mitte Jänner wiederholt, ohne das Vorhandensein von Zucker zu zeigen. Um diese Zeit begann die Pflanze zu treiben. Querschnitte

durch die jungen Triebe zeigten, mit den Reagentien behandelt, sehr reichliches Vorhandensein von Fruktose, jedoch keine Dextrose und Saccharose. Erst in einem späteren Zeitpunkt war auch Dextrose deutlich nachzuweisen. Saccharose konnte ich nicht mit Sicherheit konstatieren. Wenn Rohrzucker vorhanden war, so war seine Quantität jedenfalls verschwindend. In den jungen Blättern war nur Dextrose und Fruktose, keine Saccharose vorhanden.

Acer campestre: In der Winterruhe waren die Verhältnisse ganz analog wie bei *Broussonetia*. Die jungen Triebe enthielten Dextrose und Fruktose, jedoch keine Saccharose. Diese letztere Zuckerart war jedoch schon nach weiteren acht Tagen in größerer Menge daselbst nachzuweisen. In den Blättern zeigte sich lediglich Dextrose und Fruktose, nicht aber Saccharose.

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß im Pflanzenreich die beiden Monosaccharide Dextrose und Lävulose in der Regel gemeinsam vorkommen. Saccharose tritt häufig, aber nicht immer, in ihrer Begleitung auf. Vielleicht sind in diesen Fällen die genannten Monosaccharide aus Rohrzucker durch natürliche Inversion entstanden (Invertzucker). Bei Keimungsprozessen und beim Treiben tritt jedoch Saccharose regelmäßig erst in einem späteren Stadium der Entwicklung auf, ist also da offenbar erst durch Synthese ihrer Komponenten entstanden. Schließlich konnte auch in einem Fall gezeigt werden, daß sich in der Pflanze Dextrose in Fruktose umlagern kann, ein Prozeß, den ja bekanntlich Lobry de Bruyn in vitro vermittels sehr verdünnter Alkalien durchzuführen vermochte. Die Versuche, die individuelle Form des Zuckers bei verschiedenen Vorgängen im Leben des pflanzlichen Individuums festzustellen, werden fortgesetzt und solche bezüglich der Lokalisation des Zuckers angeschlossen.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Hofrat Prof. Dr. Julius Wiesner, sage ich an dieser Stelle für seine Ratschläge und vielfache Anregung meinen ergebensten Dank.

Erklärung der Tafeln.

Tafel I.

Fig. 1. Sternförmig angeordnete Nadeln des Fruktosemethylphenylosazons.
Fig. 2. Typisches Kristallnadelbüschel des Fruktosazons mittels Methylphenylhydrazins (nach einmaligem Umkristallisieren).
Fig. 3. Osazone aus dem Blütenboden der Tulpe, herrührend von Saccharose (nach der Behandlung mit dem Senft'schen Reagens am kochenden Wasserbade).
Fig. 4. Sphärite des Fruktosemethylphenylosazons.
Fig. 5. Verästelter Stern des Fruktosazons mittels Methylphenylhydrazins.
Fig. 6. Querschnitt durch das Blatt von *Allium cepa*. Kristallaggregate von Osazon, herrührend von Rohrzucker nach der Inversion auf dem kochenden Wasserbade mittels Methylphenylhydrazins.
Fig. 7. Sphärite des Fruktosemethylphenylosazons aus dem Blütenboden der Tulpe, herrührend von invertierter Saccharose.
Fig. 8. Osazonkristalle aus den Zwiebelschuppen von *Allium cepa*, herrührend von der Inversion der Maltose mittels des Senft'schen Reagens.

Tafel II.

Fig. 1. Querschnitt durch das Blatt von *Allium cepa*. Braune Kristallbüschel und Einzelnadeln von Fruktosazon nach der Behandlung mit Methylphenylhydrazin in der Kälte.
Fig. 2. Ebenso wie die vorige, jedoch in der Hitze, herrührend von Saccharose nach der Inversion.
Fig. 3. Osazonsterne im Querschnitt des Blattes von *Allium cepa*, und zwar im Siebteil, jedoch zum Teil auch im Xylem des Gefäßbündels.
Fig. 4. Typische gelbe, unverzweigte Sterne des Maltosazons.
Fig. 5. Querschnitt durch den Keimling von Gerste. Gelbe, unverzweigte Blättchen von Maltosazon neben Sphäriten und strahligen Gebilden von Dextrose (Lävulose) phenylosazon, herrührend von invertierter Saccharose und Maltose.